

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Keemia Instituut

Karl Rene Kõlvart

**WOLFRAMIINI EKSPRESSIOONI MÕJU DOPAMIINI
RETSEPTORITE SIGNAALIÜLEKANDERADADELE**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja: Anni Allikalt, MSc

Tartu 2017

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	5
1. VALDKONNA ÜLEVAADE	6
1.1 Signaali ülekanne.....	6
1.2 G-valguga seotud retseptorid	6
1.3 Dopamiini retseptorid	7
1.3.1 Klassifikatsioon ja struktuur	8
1.4 Wolframiin	10
1.5 Ligandi sidumiskatsed.....	12
1.5.1 Radioligandi küllastussidumise katsed	13
1.6 Fluorestsentsmikroskoopia	14
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	16
2.1 Hiirte hipokampustest retseptorpreparaatide saamine	16
2.1.1 Valmistamine	16
2.1.2 Testimine.....	16
2.2 Radioligandi küllastussidumise katsed.....	17
2.3 HEK-293 rakkude ettevalmistamine mikroskoopiakatseteks	18
2.3.1 Kasvatamine	18
2.3.2 Nakatamine	19
2.4 Fluorestsentsmikroskoopia katsed	19
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	21
3.1 Retseptorpreparaatide testimine.....	21
3.2 Küllastussidumine - K_D ja B_{max} -i määramine	22
3.3 Fluorestsentsmikroskoopia pildid ja analüüs	26
KOKKUVÕTE	30
SUMMARY	31
KASUTATUD KIRJANDUS	32
TÄNUAVALDUSED	36
INFOLEHT	37

KASUTATUD LÜHENDID

AC – ensüüm adenülaadi tsüklaas

AH – aminohape

cAMP – tsükliline adenosiinmonofosfaat

D₁-D₅ – dopamiini retseptorite alatüübid

DA – dopamiin

DMEM – Dulbecco modifitseeritud rakusööde

DPBS – Dulbecco fosfaatpuhverdatud soolalahus

DTT – ditiotreitool

EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat

ER – endoplasmaatiline retiikulum

FBS – veiseloote seerum

FL – fluorestsentsligand

FM – fluorestsentsmikroskoopia

G418 – selektsiooniantibiootikum genetitsiin

GDP – guanosiindifosfaat

GFP – roheline fluorestsentsvalk

G_{αi} – G-valk, mis inhibeerib adenülaadi tsüklaasi aktiivsust

GPCR – G-valguga seotud retseptor

G_{αs} – G-valk, mis aktiveerib adenülaadi tsüklaasi

GTP – guanosiintrifosfaat

³H – triitium

HEK-293 – inimese embrüonaalsed neerurakud

MEMO – modifitseeritud rakusööde mikroskoopia jaoks

NaBu – naatriumbutüraat

NAPS – Cy3b – Cy3b fluorestsentsmärgisega N-(p-aminofenüületüül)spiperoon

SCH23390 – (R)-(+)-7-kloro-8-hüdrosü-3-metüül-1-fenüül-2,3,4,5-tetrahüdro-1H-3-bensasepiin

SCH39166 – (6aS,13bR)-11-kloro-7-metüül-6,6a,7,8,9,13b-heksahüdro-5H-bens[d]napto[2,1-b]asepiin-12-ool

SKF38393 – 1-fenüül-2,3,4,5-tetrahüdro-1H-3-bensasepiin-7,8-diool

SKF83959 – 6-kloro-3-metüül-1-(3-metüülfenüül)-1,2,4,5-tetrahüdro-3-bensasepiin-7,8-diool

TM – transmembraanne

Wfs1 – wolframiini ekspresseeriv geen

WFS1 – wolframiini valk

WS – Wolframi sündroom

SISSEJUHATUS

Maailmas on väga palju erinevaid haruldasi haigusi, mida nende harva esinemissageduse tõttu tihtipeale süvitsi uuritud ei ole. Üks selline on Wolframi sündroom. Selle raske neurodegeneratiivse haiguse põhjuseks on mutatsioonid WFS1 geenis, mis kodeerib endoplasmaatilise retiikulumi membraanseoselist valku wolframiini. Wolframiini puudulikkus põhjustab mitmesuguseid erinevaid sümptomeid, näiteks diabeeti, optilist atroofiat, kurtust jne. Lisaks on tähele pandud, et wolframiini sündroomiga patsientide puhul on näha ka häireid dopamiinergilistes signaaliülekanderadades. Antud töös keskendutigi G-valguga seotud retseptorite perekonda kuuluvate dopamiini retseptorite uurimisele.

Käesoleva töö esimeses osas uuriti kuidas wolframiini valk mõjutab dopamiini retseptorite ekspressioonitaset. Selleks kasutati klassikalisi radioligandi sidumiskatseid, mida viidi läbi hiirte hipokampustest valmistatud retseptorpreparaatidel. Antud töö esimene eesmärk oli võrrelda dopamiini retseptorite hulka metsiktüüpi hiirte ja wolframiini puudulike hiirte hipokampustes.

Järgmise sammuna keskenduti signaaliülekanderaja esimesele etapile ehk retseptori ja ligandi vaheliste interaktsioonide uurimisele. Nende katsete läbiviimiseks kasutati dopamiini retseptoreid ekspresseerivaid inimese embrüonaalseid neerurakke, milles ühel juhul oli ekspresseeritud ka wolframiin ja teisel juhul mitte. Selleks, et uurida wolframiini mõju ligandi sidumisele rakendati antud töös fluorestsentsmikroskoopia meetodit.

1. VALDKONNA ÜLEVAADE

1.1 Signaali ülekanne

Üks elu fundamentaalseid aluseid on rakkude võime reageerida erinevatele muutustele, mis toimuvad väljaspool plasmamembraani. Hülkraksetes organismides sõltub rakkudevaheline signaali edastamine suuresti rakutüübist. Selleks, et hülkraksete organismide rakud saaksid omavahel infot vahetada, peavad nad üksteisega suhtlema. Selleks kasutavad nad mitmesuguseid keemilisi ühendeid. Taimsed rakud annavad edasi teavet kasvuhormoonide ja päikesevalguse koguse kohta. Loomsed rakud vahetavad informatsiooni näiteks ekstratsellulaarses vedelikus olevate ionide ja glükoosi kontsentratsioonist. Kõigil juhtudel on läbivaks jooneks rakkudevaheline informatsiooni edastamine, mille detekteerimine toimub spetsiifiliste valkude, retseptorite abil. Retseptorid suudavad selle info üle viia rakupoolseks vastuseks ning see toimub läbi erinevate keemiliste reaktsioonide (Nelson and Cox 2008).

1.2 G-valguga seotud retseptorid

Raku pind saab pidevalt keemilisi ja füüsikalisi signaale erinevate molekulide kaudu. Osad neist läbivad rakumembraani ning osad kinnituvad raku pinnal olevatele retseptoritele, mis põhjustab info kandumise raku sisemusse (Kleuss *et al.* 1994). Üheks suurimaks ja olulisemaks retseptorite klassiks on G-valguga seotud retseptorid (GPCR-d) (Berg *et al.* 2016).

GPCR-d, mida tuntakse ka kui seitsme transmembraanse alfa-heeliksiga retseptoreid, on suurim raku pindmiste retseptorite perekond. Ligemale 4% kõikidest valkudest, mida inimese genoomis kodeeritakse, moodustavad GPCR-d. Nad kontrollivad mitmesuguseid füsioloogilisi protsesse nagu rakkudevaheline kommunikatsioon, sünaptiline ülekanne ja hormonaalne regulatsioon. Retseptorite rakuvälise stimulatsiooni tulemusena aktiveeruvad rakusisesed valgud, mida nimetatakse G-valkudeks (Zhang and Xie 2012; Neer 1995).

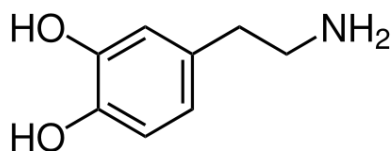
G-valgud koosnevad kolmest polüpeptiidist: α -alaühikust, mis seob ja hüdrolyüsib guanosinotriifosfaati (GTP) ning β - ja γ -alaühikutest. β - ja γ -alaühikud moodustavad omavahel dimeeri, mis laguneb ainult denatureerumisel ehk kui valgu 3D-struktuur hävineb. GTP seostumisel α -alaühikuga dissotsieerub α -alaühik retseptori ning β ja γ dimeeri küljest. Aktiveeritud α -alaühik ning $\beta\gamma$ dimeer on võimelised edasi reageerima erinevate efektoritega (nagu adenülaadi tsüklaasid (AC), fosfolipaasid ja ionikanalid) ning reguleerima nende

aktiivsust. Aktiveeritud oleku kestvus on määratud α -alaühikule omase GTP-aasse aktiivsusega, mis põhjustab GTP hüdrolüüsi guanosiindifosfaadiks (GDP) (Neer 1995; Kleuss *et al.* 1994).

GPCR-de funktsioonidega seotud häireid on kirjeldatud mitmete tavapäraste haiguste puhul nagu allergiad, depressioon, pimedus, diabeet ning mitmete südame ja veresoonkonna haiguste puhul, millel on tugevad tagajärjed tervisele. Neid retseptoreid rakendatakse laialdaselt erinevates raviskeemides, sest nende puhul on võimalik regulaatoritena kasutada väga väikeseid molekule (Zhang and Xie 2012). GPCR-d on üks kõige arvukam ravimite märklaud kehas. Nad on hetkel turul olevatest raviainetest umbes 50% sihtmärgiks (Tautermann 2014). Lisaks võtavad GPCR-dele suunatud ravimid enda alla üle veerandi sajast kõige suurema kasumlikkusega ravimist. Mõned tuntumad ravimid on näiteks atropiin, haloperidool ja morfiin (Palmer 2012). Seega GPCR-ga seotud katsesüsteemide loomine ja nendele retseptoritele vastavate ligandide skriinimine on jätkuvalt üks põhilisemaid ravimiarenduse suundi maailmas (Zhang and Xie 2012; Nelson and Cox 2008).

1.3 Dopamiini retseptorid

Dopamiin (DA), IUPAC-i järgi 4-(2-aminoetüül)benseen-1,2-diool, on imetajate ajus domineeriv katehoolamiinide alla kuuluv neurotransmitter ehk virgatsaine (**Joonis 1**). DA on oluline, sest ta kontrollib motoorikat, tunnetust, emotsioone ja toitumisvajadust (Missale *et al.* 1998). Piiridenärvisüsteemi kaudu mõjutab DA ka südame-veresoonkonda ja sisesekreetsiooni süsteeme. DA avaldab enda mõju põhiliselt dopamiinergiliste retseptorite kaudu (Zhang *et al.* 2009).



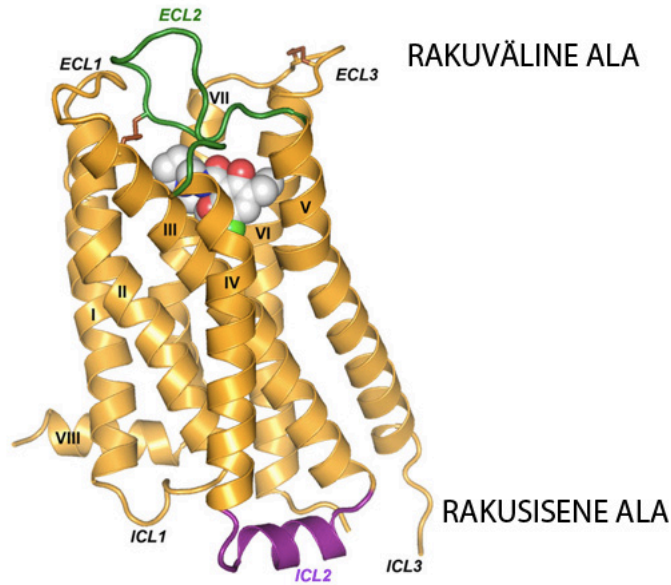
Joonis 1. Dopamiini molekuli struktuur

DA vallandumine presünaptilistest närvilõpmetest põhjustab GPCR-de perekonda kuuluvate DA retseptorite aktivatsiooni. Neid on viis alatüüpi: D₁-D₅. Nende retseptorite kaudu, kasutades erinevaid spetsiifilisi agoniste ja antagonistide, on võimalik mõjutada dopamiinergilisi signaaliradasid. Agonistid on retseptoreid aktiveerivad molekulid, mis põhjustavad erinevaid

rakusiseseid muutusi. Antagonistid on molekulid, mis seostuvad retseptoritele neid aktiveerimata ehk nad omavad agonistidele inhibeerivat toimet (Pleuvry 2004). Nende signaaliradade kaudu mõjutatakse inimese motoorikat, motivatsiooni ja kognitiivseid omadusi (Winlow 1986). Signaaliradade mõjutamine seisneb DA poolt põhjustatud signaali võimendamises või blokeerimises. Praeguseks on loodud sadu farmakoloogiliselt aktiivseid aineid, mis funktsioneerivad DA retseptorite ligandidena. Suurt osa neist ainetest kasutatakse erinevate haiguste sümptomite leevendamiseks (Beaulieu and Gainetdinov 2011). Skisofreenia ja Parkinsoni tõbi on ühed tuntumad haigused, mille korral on täheldatud düsfunktsioone dopamiinergilistes süsteemides. Nende raviks kasutataksegi erinevaid DA agoniste ja antagonistide (Missale *et al.* 1998).

1.3.1 Klassifikatsioon ja struktuur

Dopamiini retseptoreid (D_1 - D_5) klassifitseeritakse neid kodeeriva geeni järjestuse alusel, kuid võetakse arvesse ka farmakoloogilisi ning biokeemilisi parameetreid. D_1 -tüüpi (D_1 ja D_5) retseptorid seovad eelistatult bensasepiine ning aktiveerivad $G_{\alpha s}$ -valke ja D_2 -tüüpi retseptorid (D_2 , D_3 ja D_4) seovad tugevalt näiteks erinevaid bensamiide ning on seotud $G_{\alpha i}$ -valguga (**Joonis 2**). $G_{\alpha i}$ -valk ja $G_{\alpha s}$ -valk on vastavatele retseptoritele kinnitunud heterotrimeeri alaühikud, mis on puhkeolekus seotud GDP-ga. Retseptori aktivatsioonil muutub alaühiku konformatsioon ja GDP dissotsieerub. Kuna rakus on GTP-d rohkem kui GDP-d, siis seostub alaühikule GTP. Selle tulemusena vastav alaühik dissotsieerub heterotrimeerist ja mõjutab edasisi sihtmärke (Ellis 2004). D_2 retseptoril on kaks erinevat vormi: lühike (D_{2S}) ja pikk (D_{2L}). D_2 -tüüpi retseptorite aktiveerimine põhjustab AC inhibeerimise ja D_1 -tüüpi retseptorite aktivatsioonil toimub AC positiivne stimulatsioon (Zhang *et al.* 2009). Sama alatüübi retseptorid on märkimisväärselt sarnased. D_1 ja D_5 retseptorite transmembraanne osa on 80% ulatuses sarnane. D_2 ja D_3 TM alade vahel on homoloogia 75% ulatuses ning D_2 ja D_4 puhul 53%. Kuigi kõigi DA retseptorite N-terminaalne osa on üsna sarnase aminohapete (AH) arvuga, siis D_1 -tüüpi retseptorite C-terminaalne osa on umbes seitse korda pikem kui D_2 -tüüpi retseptoritel (Beaulieu and Gainetdinov 2011). C-terminus sisaldab palju seriini ja threoniini aminohappejääke ning ka tsüsteiini jääki, mis on omane kõigile GPCR-dele. Ajus on kõige enim ekspresseeritud just D_1 retseptoreid. DA retseptoritel on kahes TM aasas tsüsteiini jäägid, mis moodustavad omavahel disulfiidsideme. See side on vajalik retseptori struktuuri stabiliseerimiseks (**Joonis 2**) (Vallone *et al.* 2000; Missale *et al.* 1998).



Joonis 2. Dopamiini retseptori kristallstruktuur. Joonisel on kujutatud D₃ retseptori kompleksi antagonisti etiklopriidiga. Näha on seitset transmembraanset heeliksit. D₂-tüüpi retseptoritel on C-terminaalne saba lühem ning 3. rakuväline aas (ECL3) on suurem. Pruuni värviga on tähistatud disulfiidsidemed. ECL1-ECL3 - rakuvälised aasad; ICL1-ICL3 – rakusisesed aasad; I-VII - membraani läbivad valgu domeenid. Modifitseeritud (Chien *et al.* 2011).

D₁-tüüpi retseptorid aktiveerivad G_{αs} perekonda kuuluvaid G-valke, mis mõjutavad positiivselt läbi AC tsüklilise adenosinmonofosfaadi(cAMP) produktsiooni. Nad paiknevad postsünaptilistes dopamiinergilistes rakkudes nagu näiteks GABA-ergilised neuronid striatumis, lisaks on D₁-tüüpi retseptorite arvukust täheldatud hipokampuses (Undieh 2010; Beaulieu and Gainetdinov 2011). D₁ retseptor koosneb inimesel 446 AH-st ja D₅ retseptor 477 AH-st. Rakku läbivate heeliksiste struktuuri homoloogia on neil retseptoritel 82% ja ortosteeriliste ligandide sidumiskohad on peaaegu 100% homoloogiaga. Samas on D₁ retseptorite ekspressioon inimese ajus tunduvalt suurem kui D₅-l. Lisaks on nende kahe retseptori ekspressioonipiirkonnad ajukoes kohati väga erinevad, näiteks basaaltuumades on D₅ suures ülekaalus võrreldes D₁-ga. (Nichols 2010; Undieh 2010).

DA seostumine retseptorile olenevalt alarühmast võib olla väga erineva afiinsusega. Seega dopamiinsete agonistide ja antagonistide seostumise tugevus on väga varieeruv. Viimastel aastakümnetel on pigem keskendutud D₂-tüüpi retseptorite ligandide välja töötamisele. Kuigi on loodud selektiivseid ligande D₁ retseptori jaoks, siis ainult D₅ retseptorile spetsiifiliste

ligandide loomine on olnud väga vaevuline. Seega praegusel hetkel olemasolevad D₁ retseptorile mõeldud ligandid omavad üldjuhul sarnast afiinsust ka D₅ retseptorile (Nichols 2010; Beaulieu and Gainetdinov 2011).

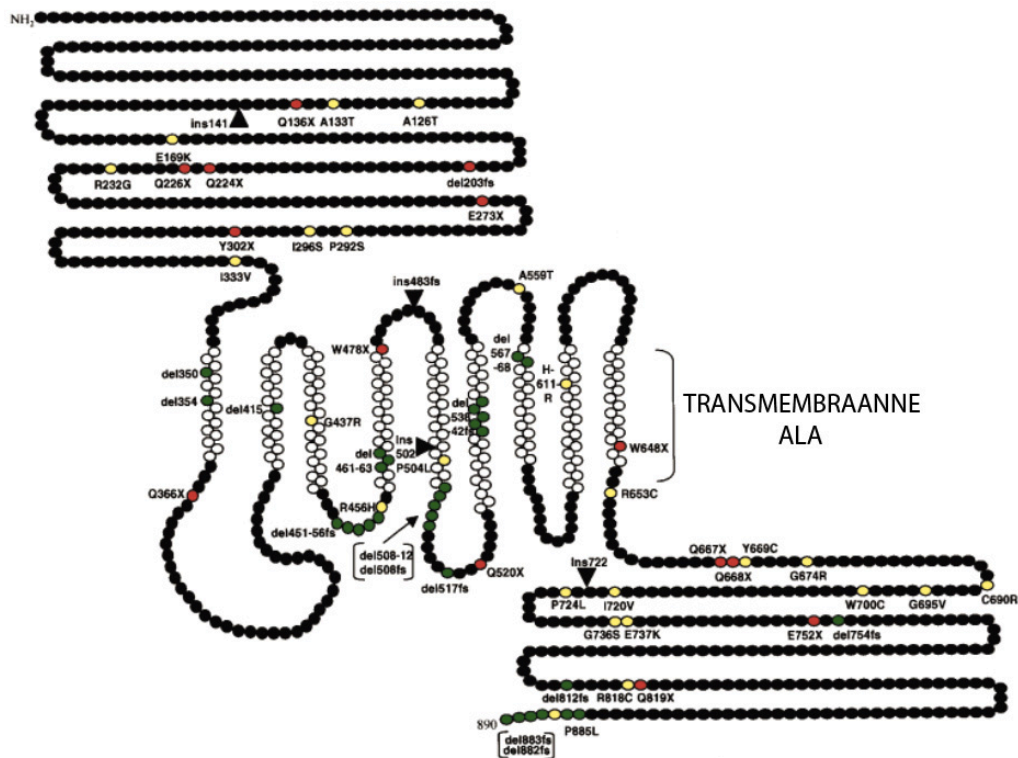
Suur osa D₁ retseptorile kõrge afiinsusega ligande loodi juba 1980ndatel aastatel. Keskenduti konkreetsele ühendi tüübile – bensasepiinid. Tänu sellele loodi mitmeid pool-agoniste ja antagonistide näiteks SCH23390, SKF38393 ja SKF83959 (Nichols 2010). Pool-agonist suudab aktiveerida retseptori, kuid ei suuda saavutada sama suurt aktiivsust kui agonist (Stolerman 2015). Need ligandid on tihedalt kasutusel ka tänapäeval erinevates sidumiskatsetes. Vaatamata nende kõrgele afiinsusele retseptorite suhtes, on nende rakusisene edasine aktiveerimine üsna nõrk. Tuntumad D₁-tüüpi retseptori ligandid on veel SCH39166 ja fenoldopaam (Nichols 2010; Zhang *et al.* 2009).

1.4 Wolframiin

Wolframiin (WFS1) on 890 AH koosnev tüüp-IV membraanne glükoproteiin (**Joonis 3**), mis paikneb endoplasmaatilises retiikulumis (ER) (Takei *et al.* 2006). Tüüp-IV tähendab seda, et proteiin läbib membraani mitu korda ja tema C-terminaalne ots on suunatud ER-i luumeni poole (Lodish *et al.* 2000). WFS1-l arvatakse olevat üheksa transmembraanset segmenti. Kuigi täpne WFS1 funktsioon on teadmata, arvatakse, et see reguleerib rakusisest Ca²⁺ taset. Lisaks sellele on täheldatud, et WFS1 vähendab ER-i stressi ja hoiab sellega ära rakkude apoptoosi. Inimeses on WFS1 ekspresseeritud enim pankreases, südames, ajus ja insuliini tootvates β-rakkudes. Täiskasvanu kesknärvisüsteemis on WFS1-te kõige rohkem striatumis, mandeltuumas ja hippokampuses – ajupiirkonnad, mida seostatakse organismi käitumusliku kohanemisvõimega (Tekko *et al.* 2014; Takei *et al.* 2006).

Wolframi sündroom (WS) on väga haruldane autosomaalse päritavusega retsessiivne neurodegeneratiivne häire (Ishihara *et al.* 2004). 1938-ndast aastast pärinevad esimesed andmed WS kohta. D. J. Wolfram ja H. P. Wagener, kes seda sündroomi esimesena uurisid, kirjeldasid WS-i kui kombinatsiooni lapseas algavast I tüüpi diabeedist ning optilisest atroofiast. WS on tuntud ka kui DIDMOAD (magediabeet (*diabetes insipidus*), suhkru-diabeet (*diabetes mellitus*), optiline atroofia ja kurtus) (Inoue *et al.* 1998). Lisaks neljale põhilisele sümptomile on WS põdevatel inimestel täheldatud psühholoogilisi probleeme ja käitumisega seotud

häireid. Haigust põdeva inimese keskmine eluiga on 30-40 aastat ning surma põhjuseks on tavaliselt hingamispuudulikkus, mille põhjustab hingamiskeskuse atroofia või toidu sattumine hingamisteedesse (de Heredia *et al.* 2013).



Joonis 3. Hüpotetiline WFS1 valgu struktuur (AH järjestus) ja mutatsioonide võimalik jagunemine. Järjestus arvutati AH järjestuse hüdrofiilsuse/hüdrofoobsuse analüüsiga (TMPred) (Khanim *et al.* 2001). Kollased AH-d tähendavad tähenduslikke mutatsioone – muutub koodoni tähendus. Punased AH-d tähendavad ebaolulisi mutatsioone – tekib stoppkoodon, mis katkestab polüpeptiidahela sünteesi. Rohelised AH-d näitavad, kus on toimunud geenideletsioon. Valged AH-d paiknevad valgu transmembraanses osas. Mustaga tähistatud AH-d asuvad kas ekstratsellulaarses matriksis või ER-i lumenis (Lüpsik 2010) (Khanim *et al.* 2001).

Wfs1 geen, mille mutatsioonid põhjustavad WS-i, kaardistati 1998. aastal. Mutatsiooni korral Wfs1 geenis aktiivset valku ei teki. Praeguseks hetkeks on WS põdevates patsientides avastatud juba üle 100 erineva Wfs1 geeni mutatsiooni. Enamus neist mutatsioonidest on kodeeritavale valgule inaktiveeriva toimega. See tähendab, et haiguse fenotüübi põhjuseks on WFS1 valgu funktsioonide kadumine (de Heredia *et al.* 2013; Ishihara *et al.* 2004). Wfs1 geeni mutatsioonide uurimisel WS-ga patsientidel, on ligi 90%-il leitud mingit tüüpi mutatsioon. Mutatsiooniga aminohappejäägid paiknevad ühtlaselt üle valgu (**Joonis 3**). See tähendab, et haiguse puhul on täheldatud kindlaid muteerunud piirkondi, mis patsientide vahel erinevad

(Khanim *et al.* 2001). WS põhjustavate muutuste paremaks uurimiseks kasutatakse näiteks hiiri, kellel on WFS1 kodeeriv geen välja lülitatud. Sellised kõksgeensed (*knock-out*) hiired on heaks mudeliks WS-i uurimisel (Luuk *et al.* 2009).

Erinevaid neuroloogilisi probleeme, mis kaasnevad Wfs1 geeni mutatsioonidega seostatakse põhiliselt häiretega dopamiinergilistes ja seratonergilistes süsteemides. Selle suuna uurimine on alles hoogu kogumas ja tähtsaid avastusi on tehtud peamiselt Eesti uurimisgruppide poolt (Visnapuu *et al.* 2013b). Võrreldes metsiktüüpi (*wild-type*) hiirtega on Wfs1 geeni defektiga isendite puhul täheldatud DA ja serotoniini transporterite madalamat ekspressiooni taset. See omakorda põhjustab eelmainitud neurotransmitterite vallandumise vähenemist presünaptilistest neuronitest. Nende süsteemide häirumise üheks võimalikuks põhjuseks on Ca^{2+} regulatsiooniga seotud muutused, mida on täheldatud Wfs1-puudulikkuse puhul. Ca^{2+} toimel avanevad presünaptilises neuronis olevad virgatsainega täidetud vesiikulid (Visnapuu *et al.* 2013a). Kui Ca^{2+} regulatsioon on häiritud võib ka virgatsainete vabastamine olla raskendatud.

Lisaks eelpool mainitule on uuritud ka WFS1-te ja D_1 retseptorit kodeeriva geeni ekspressiooni piirkondi kolme evolutsiooniliselt kauge selgroogse ajudes – koduhiir, kodukana ja punakõrvkilpkonn. Mõlema geeni ekspressiooni alad kattuvad suurel määral kõigi kolme liigi puhul. See tähendab, et miljonite aastate pikkune evolutsiooniline lahknemine pole suutnud nende valkude ekspressioonipiirkondi hajutada. Lisaks nende geenide sarnasele paiknemisele on täheldatud, et WFS1 ekspresseerub aju osades, mida seostatakse käitumisvõime ning motoorika kontrolliga (Tekko *et al.* 2017).

Uurides Wfs1-puudulike hiirte aju piirkondi, mis vastutavad emotsioonide ja motoorika eest, on märgatud seost käitumusliku kohanemisvõime häirete ja Wfs1-puudulikkuse vahel. Seega Wfs1 kõksgeensed hiired on lootustandvaks mudeliks, et disainida ja targemalt kasutada ravimeid, millega saaks leevendada selle raske sündroomiga kaasnevaid probleeme (Matto *et al.* 2011; Reimets *et al.* 2016). Seetõttu antud töös uuritigi D_1 -tüüpi retseptorite ekspressioonitaset nii normaalsetes kui ka Wfs1 kõksgeensetes hiirtes.

1.5 Ligandi sidumiskatsed

Ligandi sidumiskatsed kujutavad endast meetodit, millega saab uurida kahe molekuli vahelisi interaktsioone, näiteks valguga seostumist teise valguga, madalamolekulaarse ainega või

nukleiinhappega (Pollard 2010). Sidumiskatsetega on võimalik iseloomustada ka ligandi ja retseptori vahelisi interaktsioone, mille kaudu saab määrata ligandi afiinsust vastava retseptori suhtes, seostumise ja dissotsiatsiooni kiirust ning koes või rakkudes oleva retseptori ekspressioonitaset (Zhang and Xie 2012). Teaduses kasutatakse nii radioaktiivseid kui ka mitteradioaktiivseid meetodeid ning käesolev töö on seotud mõlematega. Suurim erinevus kahe meetodi vahel on ligandi märgistamine. Ligande märgistatakse näiteks radioisotoopide või fluorofooridega. Radioaktiivsed märgised nagu ^3H , ei oma ligandi afiinsusele mõju, sest nad on nii väikesed. Fluorestsentsligandide kasuks räägib keskkonna säästlikus ning tunduvalt lühem mõõtmiseks kuluv aeg. Lisaks on fluorestsentsmärgisega ligande ja nendega seotud interaktsioone võimalik mikroskoopidega visualiseerida. Seega mõlemad meetodid on tänapäeval laialt kasutuses ning nende vahel valimine sõltub suuresti eesmärgist (De Jong *et al.* 2005).

Radioligandi sidumiskatsed jagunevad kolmeks (Hulme and Trevethick 2010):

- Kineetilised katsed – kindla kontsentratsiooniga radioligandi seostumist mõõdetakse erinevatel ajapunktidel.
- Küllastuskatsed – tasakaalulistes tingimustes mõõdetakse seostumist erinevatel radioligandi kontsentratsioonidel.
- Väljatõrjumise katsed – tasakaalulistes tingimustes mõõdetakse kindla kontsentratsiooniga radioligandi seostumist, suurendades järk-järgult märgistamata ligandi kontsentratsiooni katsesüvendis.

1.5.1 Radioligandi küllastussidumise katsed

Esimesed radioligandi sidumiskatsed sooritati 70-ndatel (Paton and Rang 1965). Määrati radioaktiivselt märgistatud hormooni afiinsus tema retseptorile. Pärast seda on ^3H -ga ja ^{125}I -ga märgistatud ligande hakatud laialdaselt kasutama GPCR-i ja seostuva molekuli vahelise afiinsuse iseloomustamiseks. Märgistamata molekule iseloomustatakse selle põhjal, kui hästi need seostunud radioligandi retseptorilt välja tõrjuvad või kas need muudavad radioligandi afiinsust retseptorile (Zhang and Xie 2012). Tänu ligandi ja temale vastava retseptori tugevatele interaktsioonidele on *in vitro* radioligandi sidumiskatsetega võimalik spetsiifilist seostumist kvantifitseerida. Küllastussidumise tulemustest saab arvutada kahte tähtsat parameetrit: ligandi afiinsust retseptorile, K_D , ja maksimaalset retseptorite arvu, B_{\max} (Davenport and Russell 1996).

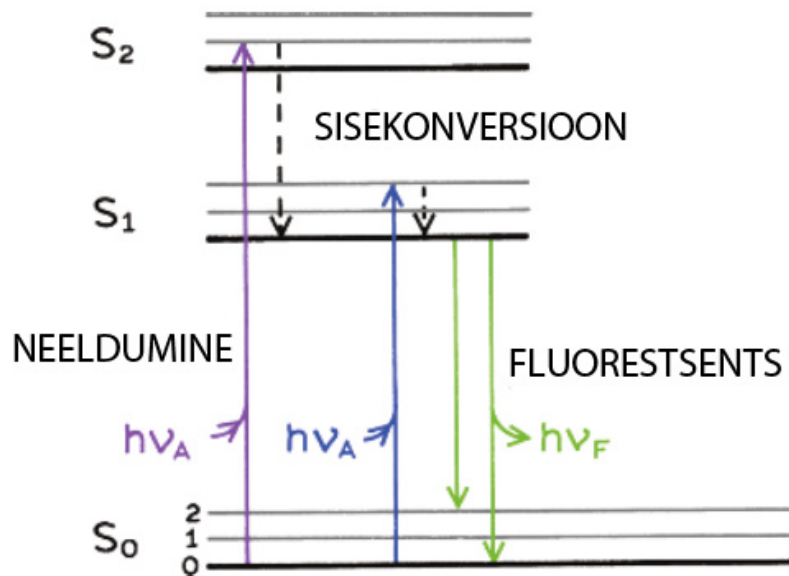
K_D (ühik M) on tasakaaluline dissotsiatsioonikonstant, mis iseloomustab ligandi seostumise tugevust vastavale retseptorile. Definitsiooni kohaselt vastab K_D -le ligandi kontsentratsioon, mille juures on seotud 50% kõigist retseptoritest. Ligand, mille K_D on 1 nM või madalam, omab vastava retseptori suhtes üsna tugevat afiinsust. K_D -d kasutades on võimalik arvutada radioligandi kontsentratsioon, mille korral toimub seostumine soovitud hulga retseptoritele (Davenport and Russell 1996).

B_{max} iseloomustab maksimaalset retseptorite ekspressioonitaset. Väärtuse saamiseks kasutatakse koe või valgu kogust antud katsesüvendis. Lõplik tulemus avaldub seotud radioligandi kontsentratsiooni ja valgu massi suhtes. Retseptorite maksimaalse tiheduse määramiseks on veel meetodeid, kuid antud töös puudutatakse ainult ligandi sidumise meetodit (Davenport and Russell 1996).

1.6 Fluorestsentsmikroskoopia

Selleks, et inimese silmale liiga väikseid objekte saaks kuidagi visualiseerida, on loodud mikroskoobid. Neil on kolm laiemat ülesannet: proovist suurendatud pildi loomine, detailide eristamine ning info transformeerimine inimese silmale või kaamerale hoomatavaks (Abramowitz and Davidson 1999). Seega mikroskoopia abil on võimalik uurida erinevaid raku tasemel toimuvaid protsesse nagu näiteks GPCR-de liikumine rakus või ligandide seostumine nendega. Laialdaselt kasutatav meetod selleks on fluorestsentsmikroskoopia (FM), mille puhul kasutatakse ära fotoluminesentsi nähtust (Hinkle and Puskas 2004). Fotoluminesents on nähtus, mille korral toimub valguse emiteerimine ainelt, mille elektronid on ergastatud olekus (Demchenko 2008).

Fotoluminesents jaguneb kaheks: fosforestsents ja fluorestsents. FM puhul kasutatakse ära fluorestsentsi nähtust. Fluorestsents põhineb Stoke'si nihkel. Ergastatud elektron liigub kõrgemale energianivoole ning pärast seda sisekonversiooni tulemusena liigub ta kõige madalamale vibratsioonilisele energianivoole (S_1). S_1 -lt liigub elektron tagasi puhkeolekusse ja selle käigus kiirgub fluorestsentsvalgus (**Joonis 4**) (Demchenko 2008).



Joonis 4. Fluorestsentsi energia diagramm. Modifitseeritud (Demchenko 2008). Joonisel on näha elektronide energiatasemeid ning ergastatud elektroni liikumist fluorestsentsi korral.

FM on tähtis tööriist, mida kasutatakse mitmetes valdkondades, näiteks biomeditsiinis ja materjaliteaduses. Tema eeliseks traditsioonilise optilise mikroskoopia ees on palju mitmekülgsemad kasutusvõimalused (Spring, K. and Davidson 2017). Täieliku sisepeegeldumise fluorestsents (TIRF) ja konfokaalne mikroskoopia on ühed tuntumad ja rakubioloogia uurimiseks enim kasutatavad FM meetodid. Nende abiga on võimalik fluorestsentsmärgisega makromolekule pildistada ja filmida. Põhiliselt uuritakse nende meetodite abiga signaaliülekande esimest etappi – membraansete retseptorite ja erinevate ligandide vahelisi interaktsioone. Mitmete kvantitatiivsete biofüüsikaliste rakenduste, kaasaarvatud ligandi sidumiskatsete jaoks tehakse eeldus, et fluorestsentsmärgisega molekul pääseb membraanile igast suunast vabalt ligi (Swift *et al.* 2010).

FM-i puhul ergastatakse proov kindla lainepikkuste vahemikuga valgusega ning emissioonil eralduv fluorestsentskiirgus filtreeritakse ergastavast valgusest. Ergastava valguse intensiivsus on sadu tuhandeid kuni miljoneid kordi intensiivsem, kui emissioonil tekkinud fluorestsentskiirgus. Õigesti seadistatud mikroskoobis jõuab detektorisse ainult emissioonist tulenev valgus. Tänu sellele näeme tumedal taustal ilusti välja joonistuvaid fluorestseeruvaid struktuure. Avastamispiir sõltub suuresti tausta tumedusest (Spring, K. and Davidson 2017).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Hiirte hipokampustest retseptorpreparaatide saamine

2.1.1 Valmistamine

WT ja Wfs1 kõksgeensete hiirte hipokampused (Scanbur, Karlslunde, Denmark), mida säilitati kuni kasutamiseni vedelas lämmastikus, saadi Kersti Lillemetsa töörühmalt Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudist. Preparaatide valmistamisel lähtuti juba eelnevalt optimeeritud protokollist, viies sisse mõningaid modifikatsioone (Tõnissaar *et al.* 2008). Kõiki lahuseid hoiti läbi protsessi jääl ning tsentrifuugimised viidi läbi 4 °C juures. Kude kaaluti ning viidi 1 ml-sse jääkülma pesupuhvrissi (50 mM Tris-HCl, pH 7,4). Kasutades Bandelin Sonoplus ultraheli sonikaatorit, homogeniseeriti lahuses olevat kudet 3 korda 10 sekundi jooksul. Saadud suspensiooni tsentrifuugiti 20 minutit 30 000 × g juures. Supernatant eemaldati ja moodustunud sade resuspendeeriti 1 ml-s jääkülmas pesupuhvriss. Edasi järgnes homogeniseerimine ja tsentrifuugimine nagu eelnevalt kirjeldatud. Kogu tsükli korralditi 3 korda. Viimane resuspendeerimine ja homogeniseerimine viidi läbi katsepuhvriss (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7,4). Katsepuhvril lisati nii palju, et homogenaatide lõppkontsentratsioon oleks 20 mg kudet/ml. Homogenaadid jaotati 800 µL kaupa alikvootideks ning säilitati -80 °C juures.

2.1.2 Testimine

Retseptorpreparaate testiti selleks, et edasistes radioligandi küllastussidumise katsetes kasutatav retseptorpreparaadi kogus oleks sobilik. Spetsiifilise sidumise adekvaatseks määramiseks peab totaalselt seostunud radioligandi kogus moodustama <10% lahuses olevast vabast radioligandist. Testimise käigus saab hinnata ka mittespetsiifilise seostumise osakaalu. Nende katsete käigus varieeriti retseptorpreparaatide kontsentratsiooni vahemikus 0,375 - 3 mg kudet süvendis.

Katseks oli vaja katsepuhvril, radioligandi ³H-SCH23390 ja dopamiini retseptoritele mittese selektiivset antagonist butaklamooli (Sigma-Aldrich). Radioligand ³H-SCH23390, mille eriaktiivsus oli 81,9 Ci/mmol, osteti firmast Perkin Elmer. Tris, HCl, KCl, EDTA, ditiotreitool (DTT), NaCl ja MgCl₂ soetati firmast AppliChem. Vahetult enne katse alustamist lisati

katsepuhvriks 1 mM DTT. Kõiki lahuseid hoiti katse ajal jääl. Parameetrid, mis läbi katsete jäid konstantseks on järgnevad: radioligandi kontsentratsioon (~4 nM), butaklamooli kontsentratsioon (1 µM), katsepuhvri koostis.

96-kohalisele U-kujulisele katseplaadile (Greiner) kanti lahuseid nii, et lõppruumala süvendis oli 250 µL (150 µL retseptorpreparaati, 50 µL radioligandi ja 50 µL puhvrit/butaklamooli). Katsed sooritati duplikaatides. Pärast lahuste viimist süvenditesse asetati katseplaat 60 minutiks loksutisse (25 °C, 400 rpm), et püstituks tasakaal. Seejärel eraldati seostumata radioligand seostunud ligandist reaktsioonisegu läbi viimisega filtreerimissüsteemist FilterMate Harvester (Perkin Elmer), kasutades klaaskiudfiltermatte (GF/B, Perkin Elmer). Filtreid pesti jääkülma pesupuhvriga (20 mM K-fosfaat, 100 mM NaCl, pH = 7,4) 5 korda. Klaaskiudfiltrid kuivatati mikrolaineahjus (2 minutit, 800W). Kuumpressi Meltilex™ Heatsealerit (Wallac) abil sulatati filtrisse tahke stsintillant Meltilex™ B/HS (Perkin Elmer). Radioaktiivsuse mõõtmiseks kasutati loendurit Wallac MicroBeta TriLux 1450 LSC Luminescence Counter (Perkin Elmer). Loendur mõõdab triitiumi lagunemisel tekkiva β-kiirguse ja stsintillandis olevate aromaatsete ühendite vahelisel interakteerumisel tekkivaid valgussähvatusi. Sähvatusi mõõdetakse cpm-des (*counts per minute*).

2.2 Radioligandi küllastussidumise katsed

Küllastussidumise katsete eesmärk oli D₁-tüüpi retseptorite sidumissaitide arvu (B_{max}) hindamine WT ja Wfs1 kõksgeensete hiirte hipokampustest. Selleks, et saada täielikud sidumiskõverad ja määrata K_D-d ning B_{max}-i, homogeniseeriti korraga kuue erineva hiire hipokampused. Sidumissaitide adekvaatsemaks hindamiseks ja saadud tulemuste kontrollimiseks tehti ka katseid individuaalsete hiirtega.

Katseks kasutati taas katsepuhvrit, millele vahetult enne katse alustamist lisati 1 mM DTT. Retseptorpreparaate inkubeeriti erinevate radioligandi ³H-SCH23390 kontsentratsioonidega (0,06 – 8 .2 nM) ilma butaklamooli juuresolekuta (totaalne seostumine) ja koos 10 µM butaklamooliga (mittespetsiifiline seostumine). Kõiki lahuseid hoiti katseplaadile kandmise ajal ja eelnevalt jääl. 96-kohalisele katseplaadile viidi lahused nii, et lõppruumala süvendis oli 250 µL sarnaselt retseptorpreparaatide testimise katsele. Edasine protseduur oli sarnane eelmises peatükis kirjeldatule.

Esimene osa katseid ($n = 3$), mis olid mõeldud täielike sidumiskõverate saamiseks, sooritati nii, et ühe katse piires kasutati 6 erineva hiire hipokampuste homogeneaati. Nendes katsetes oli hipokampuse hulk ~ 3 mg kudet/süvendis ning iga punkt pipeteeriti katseplaadile duplikaatides.

Teine osa katseid sooritati individuaalsete hiirte membraanpreparaatidega ning nende katsete eesmärk oli hinnata eri hiirte hipokampuses leiduvate dopamiini retseptorite arvu. Nendes katsetes oli hipokampuse hulk ~ 1 mg kudet/süvendis ning katsepunktid olid tripliikaatides.

Lisaks määrati radioligandi seerialahjenduste kontsentratsioonid. Selleks kasutati vedelat stsintillatsioonisegu OptiPhase HiSafe (Perkin Elmer), mida kanti spetsiaalsetesse tuubidesse 3 ml. Sinna pipeteeriti 50 μ L radioligandi lahust ning tuubid viidi koos filtritega loendurisse.

Tulemuste analüüsiks ja graafiliseks kujutamiseks kasutati programmi GraphPad PrismTM 5.00.

2.3 HEK-293 rakkude ettevalmistamine mikroskoopiakatseteks

2.3.1 Kasvatamine

Meie töörühmal on välja töötatud D_{2L} retseptorit ekspresseeriv HEK-293 rakkude püsiliin, mida antud töös kasutati (Reinart-Okugbeni *et al.* 2013). Rakke kasvatati Petri tassidel (Thermo Scientific) Dulbecco modifitseeritud Eagle'i söötmes (DMEM), millele oli lisatud 10% veiseloote seerumit (FBS), 100 U/ml penitsilliini, 100 μ g/ml streptomütsiini ning 400 μ g/ml antibiootikumi G418. Kõik eelpool nimetatud ained, välja arvatud FBS (Gibco) on ostetud firmalt PAA Laboratories. Antibiootikum G418 tagas DA geeniga rakkude selektsiooni. Rakke kasvatati niiskus-reguleeritud inkubaatoris 37 °C ja 5% CO₂ juures ja jagati iga 2-4 päeva tagant.

Rakkude loendamiseks ja elumuse määramiseks kasutati rakuloendurit T10TM Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories). Surnud rakkude osakaalu määramiseks lisati rakkudele trüpaansinist (Sigma-Aldrich). Rakkude konfluentsuse hindamiseks kasutati mikroskoopi Olympus CKX31.

2.3.2 Nakatamine

Selleks, et HEK-293 rakkudes ekspresseerida wolframiini, nakatati neid meie töögrupis kloonitud viirusega. Geen, mis viirusesse viidi, oli Wfs1 pEGFP-N2 (Addgene plasmid # 62051) (Wilkie *et al.* 2011). Viiruse kloonimise protsessiga tegeles Maris-Johanna Tahk kasutades selleks eelnevalt välja töötatud BacMam süsteemi (Mazina *et al.* 2012). Nakatamine toimus 24h tundi enne fluorestsentsmikroskoopia katset ning viirust hoiti rakkudel 5 h. Seejärel asendati viiruse suspensioon rakusöötmega MEMO (LiveLight), kuhu oli lisatud 10 mM naatriumbutüraati (NaBu) ja söötmelisandit A-d.

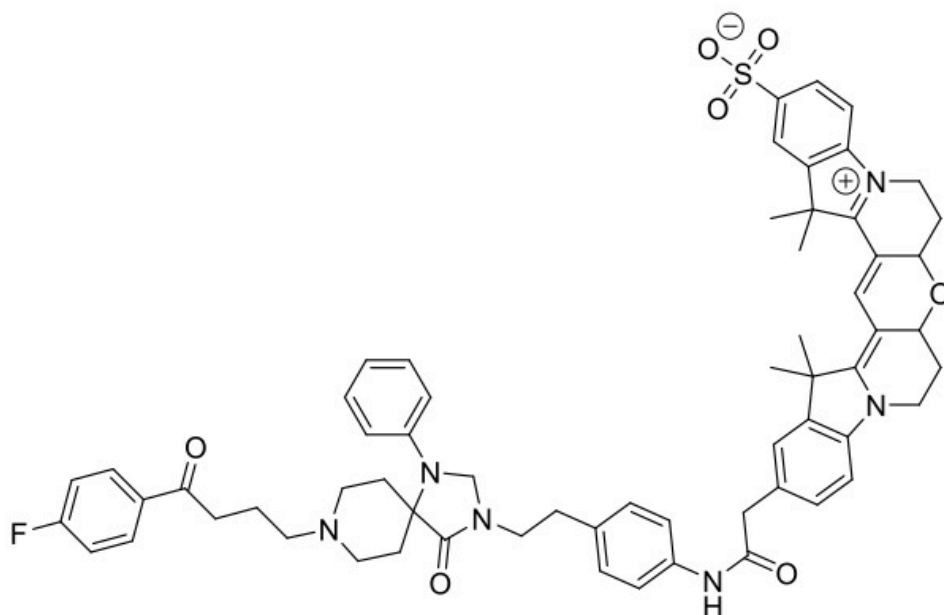
2.4 Fluorestsentsmikroskoopia katsed

Mikroskoopia katsete eesmärk oli hinnata WFS1 ekspressiooni transfekteritud rakkudes ning näha, kas antud katsemudelil WFS1 ekspressioon mõjutab fluorestsentsligandi NAPS-Cy3b (**Joonis 5**) seostumist D₂ retseptoritele. Katsed viidi läbi *high-end* iMic TIRF mikroskoobi peal (Till Photonics/FEI), mis oli ühenduses H101 mehaanilise stendiga (Prior). Objektiivid olid 4x, 20x ja 60x suurendusega (Olympus). Kaamera oli EMCCD 885 (Andor). Proovide ergastamiseks kasutati 488 nm PhoxX laserdiodi ja 561 nm DPSS (ingl. k. *diode-pumped solid-state*) laserit Cobolt Jive (Lamber Instruments/Omicron). 488 nm laseri puhul suunati valgus läbi zt 491 rdcxt dikromaatse peegli objektiivile ja tagasitulev valgus filtreeriti läbi Brightline HC 525/45 filtri. 561 nm laseri puhul suunati valgus läbi T570LP dikromaatse peegli objektiivile ja tagasitulev valgus filtreeriti läbi ET 620 filtri.

8-kohalisele spetsiaalsele mikroskoopia katseplaadile (Labtech) viidi ~48h enne katset HEK-293 rakud, et nad jõuaksid kinnituda. Esimese katses kasutati neljas süvendis rakuarvu 45000 ja neli süvendit olid rakuarvuga 22000. Teises katses olid kõik süvendid rakuarvuga 22000. Rakke nakatati WFS1 viirusega (MOI 30) vastavalt eelnevas punktis kirjeldatule. Mikroskoopiakambri temperatuur oli 37 °C ja CO₂ tase oli 5%.

Selleks, et kontrollida rakkude tihedust ja paiknemist kasutati algul 4x suurendusega õhk-objektiivi. Peale seda lülituti ümber 20x suurendusega õliobjektiivi peale, et leida sobilik piirkond, kus WFS1 ekspressiooni kontrollida. Kui piisava rakutihedusega piirkond oli leitud, lülituti ümber 60x õliobjektiivile. WFS1 oli märgistatud rohelise fluorestsentsvalguga (GFP), seega ergastamisel 488 nm lainepikkusega valgusega, saab kontrollida WFS1 ekspressiooni. Pärast WFS1 ekspressiooni kontrollimist lisati süvendisse 1 nM fluorestsentsligandi (FL)

NAPS-Cy3b, mis on D₂-tüüpi retseptorite antagonist (**Joonis 5**). Ligand sünteesiti Tartu Ülikooli orgaanilise keemia õppetoolis Mihkel Illisoni poolt. FL-i seostumist vaadati samuti 60x õli-objektiiviga. Ligandi fluorestsentsmärgise neeldumismaksimum on 559 nm juures, seega ergastamine toimus 561 nm lainepikkusega laseriga. Filtrid ja laserid valiti nii, et WFS1 ekspressiooni ja FL-i seostumist membraanidega ei oleks korraga näha. Pildid tehti ühest fikseeritud kohast nii *brightfieldis* kui ka fluorestsentsrežiimis, kasutades kõiki eelmainitud lasereid koos vastavate filterkuubikutega.

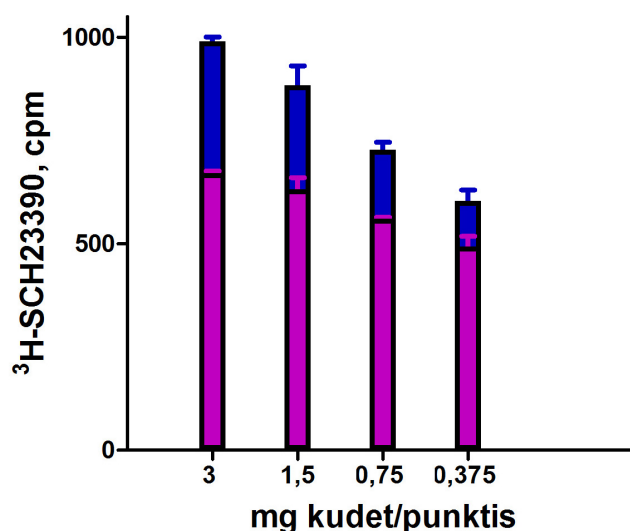


Joonis 5. Töös kasutatud fluorestsentsligand NAPS-Cy3b struktuur. Ligand koosneb D₂ retseptori antagonisti osast (NAPS) ja fluorestseeruvast märgisest Cy3b.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

3.1 Retseptorpreparaatide testimine

Uute membraanpreparaatide kasutamisel on esmalt oluline kontrollida retseptorite olemasolu ning hinnata mittespetsiifilise seostumise osakaalu. Lisaks sellele on vaja optimeerida retseptorpreparaadi kontsentratsioon katsesüvendis, et saaks läbi viia radioligandi küllastussidumist. Retseptorpreparaadi hulk võiks olla selline, et totaalsel sidumisel detekteeritav radioaktiivsus moodustaks vähem kui 10% kogu lisatud ligandi radioaktiivsusest. Selle saavutamiseks viidi läbi katse, kus preparaadi kontsentratsiooni varieeriti 0,375 – 3 mg süvendis. Selliste kontsentratsioonide kasutamise tingis asjaolu, et hiirte hipokampused on väga väiksed (~25 mg) ning suurema koehulga kasutamine pole seetõttu võimalik.



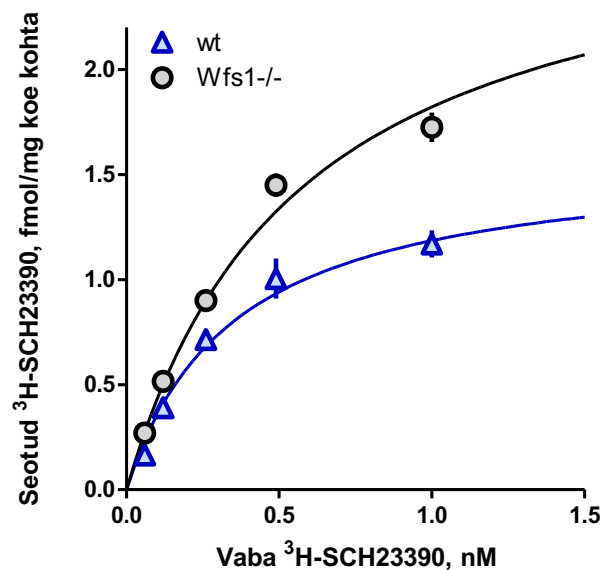
Joonis 6. Membraanpreparaatide testimine küllastussidumise katsete jaoks. Varieeriti retseptorpreparaadi kontsentratsiooni. Katsepunktid on teostatud tripikaatides ning graafikul on toodud keskmised tulemused \pm SEM. Lilla värv vastab mittespetsiifilisele ja sinine värv totaalsele seostumisele.

Joonisel 6 on näha erinevate membraanpreparaatide kontsentratsioonidele vastavat totaalselt seostumist (cpm-des). Lisaks on välja toodud ka mittespetsiifiline seostumine, mis moodustab totaalsest üsna suure osa. Suur mittespetsiifika on tõenäoliselt tingitud sellest, et tegemist on elusa organismi koega, milles on peale rakumembraanide suurel määral ka muud bioloogilist materjali, mida on raske kõike välja pesta ja kuhu ligand saab seostuda. Katsetest oli näha, et D₁-tüüpi retseptorid on antud hiirte hipokampustest ekspresseeritud ning antud töös kasutatud

metoodikaga on neid ka võimalik detekteerida. Tulemustest on näha, et mida rohkem kudet kasutada, seda suurem on spetsiifilise seostumise osakaal. Samas kasvab ka mittespetsiifiline seostumine. Antud töös kasutati individuaalsete hiirtega katsete jaoks 1 mg kudet süvendis (maksimaalne võimalik) ja kõverate puhul 3 mg kudet süvendis. Nii jätkus retseptorpreparaati kõigi katsepunktide jaoks. Kuigi WFS1 puhul on nähtud pigem seost D_1 retseptoriga, siis me mõõtsime nii D_1 kui ka D_5 retseptori taset, sest neid on eraldi väga raske mõõta. Hiire hipokampuses on enim ekspresseeritud D_1 ja D_2 retseptorid, seega D_5 osakaal oli minimaalne (Gangarossa *et al.* 2012).

3.2 Küllastussidumine - K_D ja B_{max} -i määramine

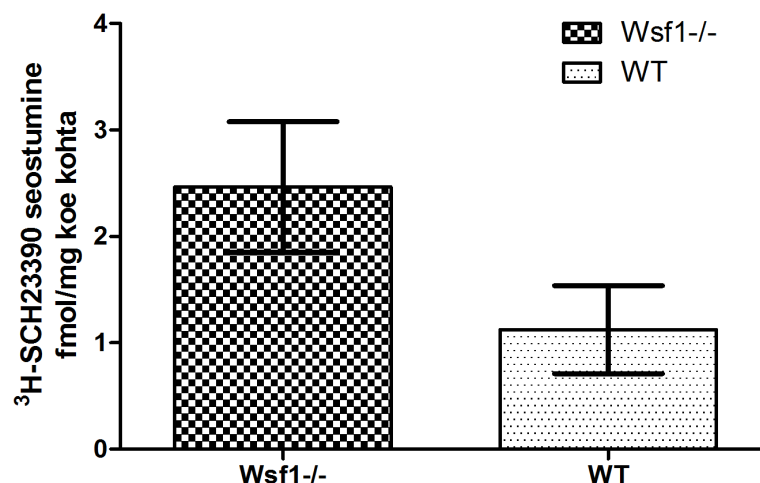
Pärast membraanpreparaatide testimist hinnati järgmise sammuna radioligandi afiinsust vastavatele retseptoritele dissotsiatsioonikonstandi K_D kaudu. Selleks viidi läbi kolm katset, kus igas kasutati kuue erineva metsiktüüpi või Wfs1 kõksgeense hiire hipokampuste homogenaate. Hiirte arv on tingitud sellest, et soov oli saada täielikud sidumiskõverad ning selleks vajaliku koe hulka saavutati vaid juhul kui kasutati mitme hiire hipokampust. Sidumiskõveratel oli kaheksa erinevat kontsentratsioonipunkti, millest viit on näha kõveratel (**Joonis 7**). Radioligandi kontsentratsioonide valmisel lähtuti kirjandusest leiduvast K_D -st 0,44 nM (Zhou *et al.* 1990; Ricci and Amenta 1994). Selleks, et katsepunktid jaotuksid ühtlaselt kõvera platoo ning tõusu vahel kasutati radioligandi kontsentratsioone, millest pooled olid K_D -st suuremad ja ülejäänud olid K_D -st väiksemad. Lisaks K_D -le leiti sidumiskõveratelt ka B_{max} -i väärtused.



Joonis 7. Spetsiifiline seostumine radioligandi erinevatel kontsentratsioonidel metsiktüüpi ja Wfs1 kõksgeensete hiirte puhul. Katsed on teostatud kolmes korduses, duplikaatides. Joonisel on kõigi kolme katse keskmised tulemused \pm SEM.

Kõverate analüüsimisel oli näha, et metsiktüüpi hiirtel on tunduvalt madalam D_1 -tüüpi retseptorite ekspressioonitase (**Joonis 7**). B_{max} -i väärtused olid 4.03 ± 1.31 fmol/mg koe kohta kõksgeensete ja 1.45 ± 0.10 fmol/mg koe kohta metsiktüübi puhul. K_D -d olid mõlematel hiirtel väga sarnased (metsiktüübil 0.31 ± 0.06 ja kõksgeensetel hiirtel 0.48 ± 0.08 nM). Sellegipoolest väärtused päris samad ei ole, mille üheks põhjuseks võib olla D_1 ja D_5 tüüpi retseptorite erinev arvukus sõltuvalt hiiretüübist.

Pärast sidumiskõverate saamist sooritati katseid ka individuaalsete hiirtega. See oli vajalik selleks, et kontrollida kas sama tulemus on nähtav ka iga hiire puhul. B_{max} ehk maksimaalne D_1 -tüüpi retseptorite sidumissaitide arv määrati 4 nM radioligandi kontsentratsiooni juures, mis on umbes $8 \times K_D$. Kontsentratsioon, mille juures tavaliselt B_{max} -i määratakse peaks jääma vahemikku $5-10 \times K_D$ (Hein et al. 2017). B_{max} on tegelikult ainult teoreetiline väärtus, reaalses elus seda määrata ei ole võimalik, sest selleks oleks vaja lõpmatult suurt radioligandi kontsentratsiooni. Käesolevas töös kasutatud 4 nM kontsentratsiooni juures on seotud ligikaudu 90 % retseptoritest.



Joonis 8. Individuaalsete metsiktüüpi ja kõksgeensete hiirte D₁-tüüpi retseptorite sidumissaitide tasemed. Saitide taset hinnati 4 nM radioligandi kontsentratsiooni juures. Katsepunktid on triplikaatides. Joonisel on kõigi hiirtega tehtud katsete keskmine tulemus ± SEM.

Joonisel 8 on välja toodud mõlemat tüüpi hiirte D₁-tüüpi retseptorite ekspressioonitasemed koos veavälpadega (± SEM). Kõksgeensete hiirte puhul saadi väärtuseks 2.8 ± 0.5 fmol retseptorit/mg koe kohta ($n = 24$) ja metsiktüüpi hiirte puhul 1.4 ± 0.3 fmol retseptorit/mg koe kohta ($n = 22$), $P < 0,05$ ehk tulemused on statistiliselt erinevad. Wfs1 kõksgeensete hiirte B_{\max} on peaaegu 2 korda suurem kui metsiktüübil. Seega tulemused langevad kokku eelnevalt saadud täielikelt sidumiskõveratelt pärineva infoga. Mõlemat tüüpi hiirte puhul on täheldatav suuri veavälpasid, mille üheks põhjuseks võib olla hiirte individuaalsed eripärad. Katses kasutati meessoost ja naissoost isendeid segamini. Veavälpade vähendamiseks oleks võinud ühe soost isendeid eraldi analüüsida.

Sidumiskatsed annavad veenvaid tõendeid WFS1 seosest dopamiinergilise signaaliülekanega. Suurenenud D₁-tüüpi retseptorite arv kõksgeensetes hiirtes viitab muutustele postsünaptilises dopamiiniregulatsioonis juhul kui wolframiini valku organismis ei ekspresseerita. Üks võimalik hüpoteetiline seletus on vähenenud dopamiini sekreteerimine dopamiinergilistest neuronitest (Matto *et al.* 2011). Selle kompenseerimiseks ehk normaalse signaaliülekande säilitamiseks on postsünaptilisel neuronil vaja rohkem D₁-tüüpi retseptoreid. D₁-tüüpi retseptorite suurem ekspressioonitase võibki olla põhjustatud sellest, et dopamiini, mis retseptoreid aktiveeriks, vabaneb vähem ning selleks, et iga agonisti molekul kinni püüda ja

signaaliülekanne efektiivsemaks muuta, tuleb suurendada retseptorite hulka plasmamembraanil. Hetkel on tegemist siiski vaid hüpoteesiga, mida tuleks kindlasti edaspidistes töödes kontrollida.

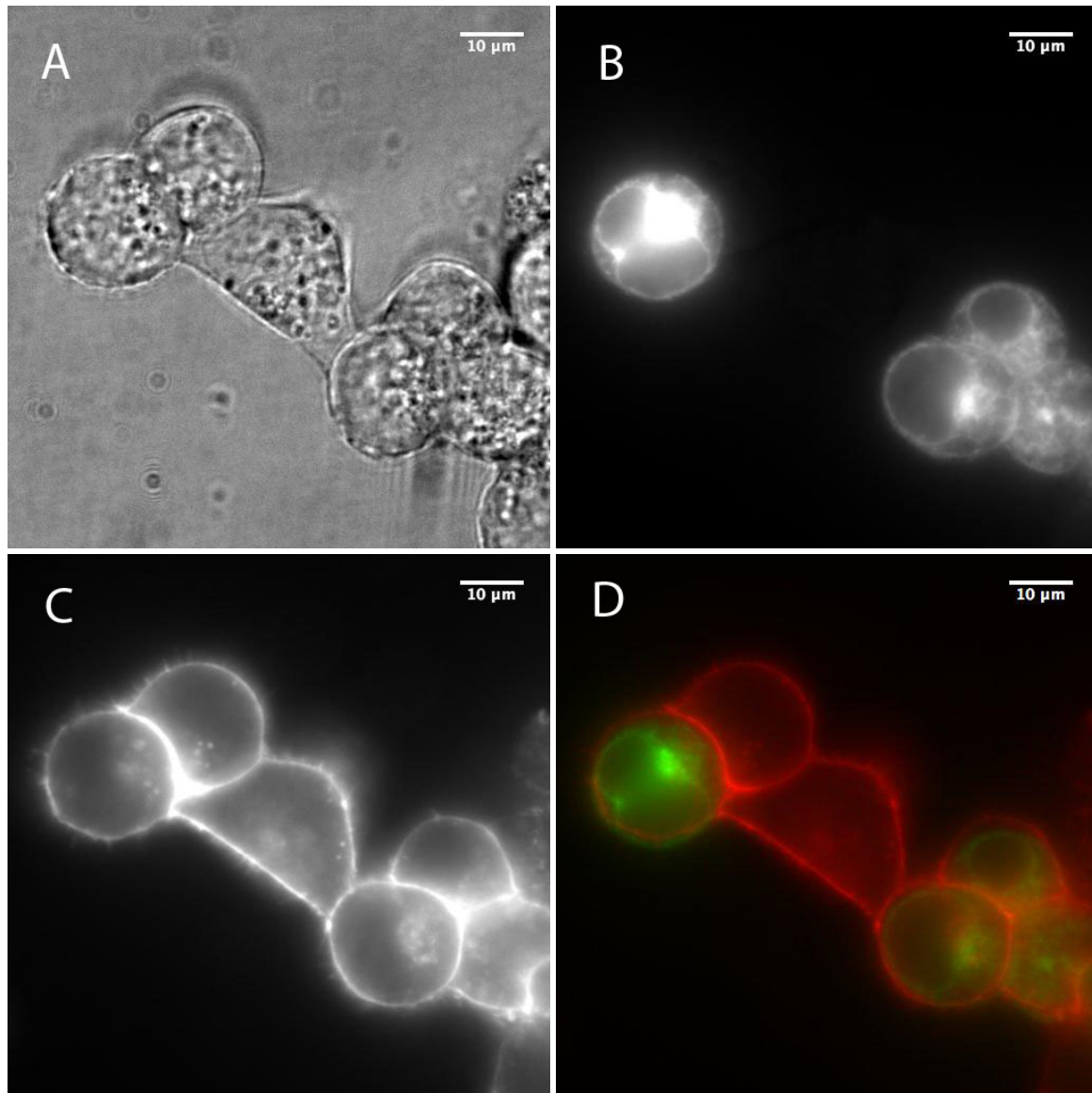
Lisaks on kõksgeensetes hiirtes täheldatud apomorfiini kõrgendatud ja amfetamiini nõrgendatud mõju võrreldes metsiktüübiga (Visnapuu *et al.* 2013a). Apomorfiin on dopamiini retseptorite agonist ning amfetamiin on molekul, mis indutseerib dopamiini sekretsiooni presünaptilisest neuronist (Jenner and Katzenschlager 2016; Windels and Kiyatkin 2006). Apomorfiini suurem aktiivsus võib samuti viidata D₁-tüüpi retseptorite kõrgemale ekspressioonitasemele. Mida rohkem on retseptoreid, seda rohkem apomorfiini saab seostuda ning seda suurem on antud signaaliülekanteraja aktivatsioon. Seega kirjanduses leitud seosed wolframiini puudumise ja dopamiinergilise süsteemi vahel sobituvad hästi antud töös saadud tulemustega.

Käesoleva töö raames funktsionaalseid uuringuid ei tehtud ehk signaaliülekanteradade edasiste etappide kohta infot ei saadud. Järgmise sammuna võiks võrrelda kõksgeensete ja metsiktüüpi hiirte D₁-tüüpi retseptorite aktiveerimist. Seda saaks teha näiteks cAMP-i akumulereerimise katsega. Agonisti sidumisel D₁-tüüpi retseptorile aktiveerub G_s-valk, mille α alaühik põhjustab AC aktiivsuse kasvu. AC muundabki ATP cAMP-iks ja kasutades näiteks radioaktiivselt märgistatud adeniini nukleotiidi, on võimalik mõõta cAMP-i akumulereerumise taset. Meie töörühmas on kasutusele võetud ka cAMP-i biosensor, mida saaks samuti rakendada funktsionaalseteks uuringuteks (Mazina *et al.* 2012). Selleks aga, on vaja elus rakkude primaarkultuuri, mille kasvatamine on praktilisest seisukohast väga keeruline.

Veel üks võimalik põhjus D₁-tüüpi retseptorite rohkusele kõksgeensetes hiirtes on ebaefektiivne retseptorite biogenees (Tekko *et al.* 2017). Wfs1-puudulikkuse korral on täheldatud kõrgendatud ER stressi, mis viib ER-i normaalse töö balansist välja. ER-i normaalne funktsioneerimine on vajalik D₁-tüüpi retseptorite dimerisatsiooniks teiste retseptoritega (Mallol *et al.* 2006). Seega D₁-tüüpi retseptorite rohkus võib viidata sellele, et monomeerseid retseptoreid on raku plasmamembraanis rohkem, et kompenseerida puuduvaid retseptorite homo- või heterodimeere. Selle hüpoteesi kontrollimiseks oleks vaja sooritada katseid ligandidega, mis seostuvad retseptorite dimeeridele. Antud töö sooritamise hetkel kahjuks selliseid ligande ei õnnestunud saada.

3.3 Fluorestsentsmikroskoopia pildid ja analüüs

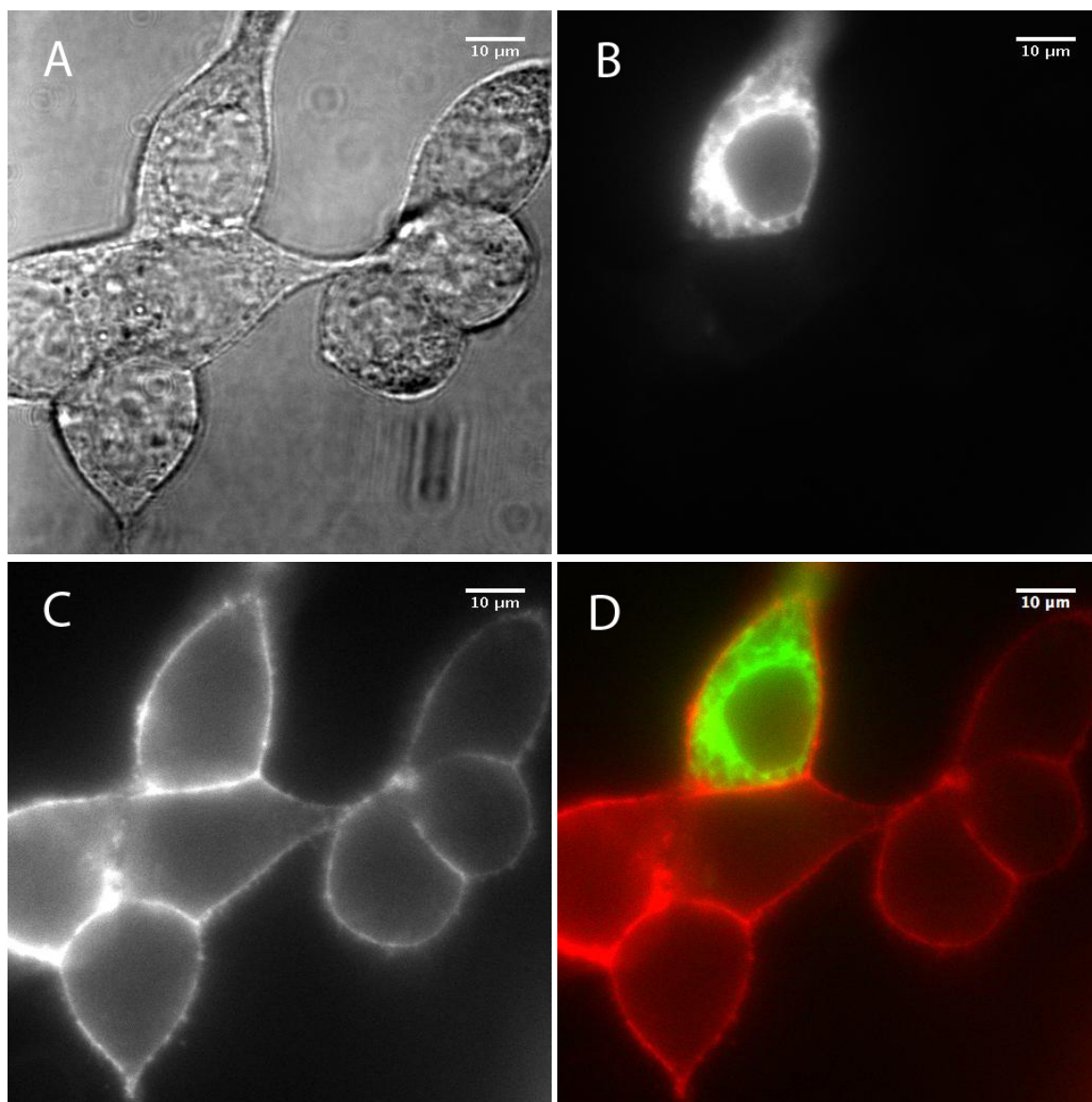
Mikroskoopia katsete eesmärk oli kontrollida, kas WFS1 tugev ekspressioon HEK-293 rakkudes mõjutab D₂ retseptoritele seostumist. Hüpotees oli, et WFS1 normaalsest kõrgem ekspressioon võib mõjutada dopamiini retseptorite biosünteesi ja seega ka seostumist ligandile.



Joonis 9. Katse HEK-293 rakkudega, kus osades on ekspresseerunud WFS1-te. Pildil A on rakke näha valges valguses (*brightfield*). Pildil B on näha rakke, kus WFS1 on ekspresseerunud. Pildil C on näha FL-i seostumist membraaniga. Pildil D on pildid B ja C asetatud üksteise (*overlay*) peale ja vastavad fluorestsentskiirgused on kuvatud erinevates värvides. Pildid on tehtud iMic TIRF mikroskoobiga kasutades Olympus TIRF APON 60x objektiivi.

Esimese katsega kontrolliti, kuidas katsemudel töötab ja teise katsega üritati esimese katse tulemusi reprodutseerida. Kuna olemas olid püsiv D₂ retseptorit ekspresseeriv rakuliin ja vastav FL, siis viidi katse läbi kasutades neid. Esimese sammuna kontrolliti kas wolframiini ekspresseerimine HEK-293 rakkudes õnnestus. Vastava laseriga ergastades oli näha WFS1 ekspressioonipiirkondasid (**Joonis 9B**). WFS1 paikneb raku sees justkui võrgustikuna. See tuleneb sellest, et WFS1 paikneb rakus ER-i membraanil (Fonseca *et al.* 2005). Jooniselt on näha, et wolframiini ei ole kõikides rakkudes ekspresseeritud. Kuuest rakust, mida *brightfieldi* pildil (**Joonis 9A**) on võimalik näha, on wolframiini toodetud vaid neljas (**Joonis 9B**). Tõenäoliselt on põhjuseks see, et WFS1 viirus ei jõudnud kõiki rakke nakatada. See tähendab, et viiruse transfektsiooni efektiivsus päris 100% ei ole. Selleks, et saavutada 100% efektiivsus on võimalik viiruse kogust suurendada, kui antud katse jaoks on just vajalik, et kõik rakud ei ekspresseeriks wolframiini. Nii on võimalik võrrelda ligandi sidumist rakumembraanile rakkudes, kus wolframiin on olemas ning rakkudes kus seda ekspresseeritud pole.

Järgmiseks kontrolliti, kas FL lisamisel süvendisse toimub seostumine rakumembraanil paiknevatele D₂ retseptoritele. Vastava laseriga ergastades ning valgust õigel lainepikkusel filtreerides, muutus fluorestsentsmärgisega ligand nähtavaks (**Joonis 9C**). Ligand seostus ühtlaselt üle terve membraani. Intratsellulaarses alas oli intensiivsus madal ehk ligand raku sisse väga ei olnud läinud. Tähtis on see, et kasutades õigeid lasereid ja filtreid oli võimalik WFS1 ja D₂-retseptoritele ligandi seostumist eraldi jälgida. See tähendab, et wolframiini rohelise fluorestsentsvalgu kiirgus ei kattu spektraalselt ligandi fluorestsentskiirgusega, mistõttu wolframiini ja dopamiini retseptoreid on võimalik eraldi vaadata. **Joonis 9D** puhul on ühendatud pildid 9B ja 9C (*overlay*). See tähendab, et ühe pildi peal on näha kahel erineval lainepikkusel ergastatud rakkude fluorestsentskiirgust.



Joonis 10. Katse HEK-293 rakkudega, kus osades on ekspresseerunud WFS1-te. Pildil A on rakke näha valges valguses (*brightfield*). Pildil B on näha rakke, kus WFS1 on ekspresseerunud. Pildil C on näha FL-i seostumist membraaniga. Pildil D on pildid B ja C asetatud üksteise (*overlay*) peale ja vastavad fluorestsentskiirgused on kuvatud erinevates värvides. Pildid on tehtud iMic TIRF mikroskoobiga kasutades Olympus TIRF APON 60x objektiivi.

Teise katse tulemused ühtisid esimese katsega (**Joonis 10**). Ainuke erinevus esimesest katsest oli nakatunud rakkude arv. Teises katses oli see tunduvalt madalam, kuigi viiruse kogus jäi samaks ning mõlema katse jaoks kasutati värsket viiruse emalahust (*stock*).

Mikroskoopia katsete eesmärk oli kontrollida, kas WFS1 tugev ekspressioon HEK-293 rakkudes mõjutab D₂ retseptoritele seostumist. Hüpotees oli, et WFS1 normaalsest kõrgem

ekspressioon võib mõjutada dopamiini retseptorite biosünteesi ja seega ka seostumist ligandile. Esimese katsega kontrollisime, kuidas katsemudel töötab ja teise katsega üritasime esimese katse tulemusi reprodutseerida. Mõlema katse mikroskoopiapiltidele tuginedes, saab väita, et selle katsemudeliga WFS1 ekspressioon HEK rakkudes D_2 retseptorile sidumist oluliselt ei mõjuta.

Selleks, et veenduda, kas wolframiini ekspressioon mõjutab ligandi sidumist D_2 retseptoritele, peaks samu katseid sooritama ka mõnel muul rakuliinil, näiteks D_2 retseptoreid endogeenselt ekspresseerivatel rakkudel. Samuti on plaanis ligandina kasutada fluorestsentsmärgisega agonisti. Lisaks on plaanis proovida rakkudes ekspresseerida samamoodi WFS1-te, aga juurde indutseerida ER-stressi ning vaadata, kas D_2 retseptoritele seostumine on normaalsest erinev. Kindlasti võiks sama katsesüsteemiga testida D_1 -tüüpi retseptoreid ekspresseerivaid rakke, sest nende puhul on kindlaid tõendeid seostest WFS1-ga. D_1 retseptoritega püsiliin on meie töörühmas küll olemas, kuid probleemiks on antud rakuliinis suurte rakuagregaatide moodustumine. Selleks, et mikroskoopias rakke vaadata oleks vaja rakud üksteisest eraldi saada. Siiani oleme üritanud seda saavutada käepäraste vahenditega, kuid see pole õnnestunud. Järgmiseks on plaanis tellida rakuagregaatide vähendamiseks vastav reagent Accumax.

KOKKUVÕTE

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti dopamiini retseptorite ja wolframiini vahelisi seoseid. Esmalt uuriti, kuidas Wfs1-puudulikkus mõjutab D₁-tüüpi retseptorite hulka hipokampuses. Selle jaoks viidi läbi radioligandi sidumiskatseid D₁-tüüpi retseptorite selektiivse ligandiga ³H-SCH23390. Teiseks tehti katseid fluorestsentsmikroskoobiga, et uurida wolframiini mõju ligandi seostumisele.

Teoreetilises osas käsitleti mitmeid olulisi teemasi, mis puudutavad tehtud tööd. Räägiti dopamiini retseptoritest, mis on G-valguga seotud retseptorite üks klass. Peale selle kirjeldati wolframiini valku ning probleeme, mis kaasnevad seda valku kodeeriva geeni mutatsioonidega. Põgusalt seletati ka ligandi sidumiskatseid ning fluorestsentsmikroskoopiat, mis olid antud töö kontekstis olulised töövahendid lõpptulemuse saavutamiseks.

Antud töö tulemusena suudeti esimest korda näidata otsest seost WFS1-e ja D₁-tüüpi retseptorite ekspressioonitaseme vahel. D₁-tüüpi retseptorite hulk metsiktüüpi ja kõksgeensete hiirte vahel oli statistiliselt erinev. Saadud tulemused on publitseeritud käesoleva aasta alguses ilmunud teadusartiklis (Tekko *et al.* 2017). Mikroskoopia abil uuriti signaaliülekanne esimest etappi ehk retseptori ja ligandi vahelisi interaktsioone. Kahe mikroskoopia katse tulemuse põhjal saab väita, et WFS1-e ekspressioon sellise katsemudeli puhul D₂-le seostumist ei mõjuta.

Järgmise sammuna oleks soov uurida D₁-tüüpi retseptorite signaaliülekanne esimest etappi rakkudes, kus on ekspresseeritud WFS1 ja rakkudes, kus wolframiini ei ole. Esimese etapi uurimine sarnaneks töö teises osas kirjeldatud mikroskoopia katsetega. Edasiste signaaliülekanne etappide uurimiseks sobib meie töörühmas kasutusel olev cAMP-i kontsentratsiooni muutust määrav biosensor.

SUMMARY

The aim of this bachelor's thesis was to study the connections between dopamine receptors and wolframine. First of all, the expression levels of D₁-type receptors in wild-type and WFS1 knock-out mice were compared. For accomplishing that, radioligand(³H-SCH23390) binding assay was used. Secondly experiments with fluorescence microscope were done to study wolframines influence to ligand binding.

Many important subjects connected to the work that has been done were discussed in the literature review. Dopamine receptors which are a class of GPCR-s were introduced. Furthermore wolframine protein and health problems that are associated with the mutations in the wolframine encoding gene were addressed. A short insight was also given to topics like ligand binding assays and fluorescence microscopy.

For the first time the link between WFS1 and D₁-like dopamine signalling was shown. The expression levels of D₁-like receptors between WFS1 knock-out mice and wild-type mice were statistically significant. The data obtained is also published in an article which was published in march this year (Tekko *et al.* 2017). The first stage of signal transduction was studied using microscopy. Additionally the data obtained from the two microscopy experiments show that with this kind of experiment set-up the expression of WFS1 doesn't affect the binding to D₂ receptor.

The next step is to study the first stage of signal transduction of D₁-type receptors in cells where WFS1 is expressed and in cells where it is not. The experiments would be similar to the ones that were described in the second chapter of the thesis. To study subsequent signal transduction stages cAMP concentration dependant biosensor which is used in our research group could be used.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abramowitz M. and Davidson M. *Introduction to Microscopy*; <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/introduction.html> viimati uuendatud 13.11.2015
- Beaulieu J.-M., Gainetdinov R. R. (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* **63**, 182–217.
- Berg J., Tymoczko J., Stryer L. (2016) Biokeemia aitab meil mõista maailma. *Tallinna Teh. kirjastus*, 832.
- Chien E. Y. T., Liu W., Zhao Q., Katritch V., Han G. W., Michael a, Shi L., et al. (2011) Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science (80-.)*. **330**, 1091–1095.
- Davenport A. P., Russell F. D. (1996) *Radioligand Binding Assays: Theory and Practice*.
- Demchenko A. P. (2008) Introduction to Fluorescence Sensing Introduction to Fluorescence Sensing. 1–26.
- Ellis C. (2004) the State of GPCR Research in 2004. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 577–626.
- Fonseca S. G., Fukuma M., Lipson K. L., Nguyen L. X., Allen J. R., Oka Y., Urano F. (2005) WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 39609–39615.
- Gangarossa G., Longueville S., Bundel D. De, Perroy J., Hervé D., Girault J. A., Valjent E. (2012) Characterization of dopamine D1 and D2 receptor-expressing neurons in the mouse hippocampus. *Hippocampus* **22**, 2199–2207.
- Hein P., Michel M.C., Leineweber K., Wieland T., Wettschureck N., Offermanns S. *Receptor and Binding Studies* <http://eknygos.lsmuni.lt/springer/374/Part%202/6/8%20Item.pdf> viimati alla laetud 22.05.2017
- Heredia M. L. de, Cléries R., Nunes V. (2013) Genotypic classification of patients with Wolfram syndrome: insights into the natural history of the disease and correlation with phenotype. *Genet. Med.* **15**, 497–506.
- Hinkle P. M., Puskas J. a (2004) Detection of G protein-coupled receptors by immunofluorescence microscopy. *Methods Mol. Biol.* **237**, 127–34.
- Hulme E. C., Trevethick M. A. (2010) Ligand binding assays at equilibrium: Validation and interpretation. *Br. J. Pharmacol.* **161**, 1219–1237.
- Inoue H., Tanizawa Y., Wasson J., Behn P., Kalidas K., Bernal-Mizrachi E., Mueckler M., et al. (1998) A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes

- mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat. Genet.* **20**, 143–8.
- Ishihara H., Takeda S., Tamura A., Takahashi R., Yamaguchi S., Takei D., Yamada T., et al. (2004) Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive β -cell loss and impaired stimulus - Secretion coupling in insulin secretion. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1159–1170.
- Jenner P., Katzenschlager R. (2016) Apomorphine - pharmacological properties and clinical trials in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 1–9.
- Jong L. A. A. De, Uges D. R. A., Franke J. P., Bischoff R. (2005) Receptor-ligand binding assays: Technologies and applications. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **829**, 1–25.
- Khanim F., Kirk J., Latif F., Barrett T. G. (2001) WFS1/wolframin mutations, Wolfram syndrome, and associated diseases. *Hum Mutat* **17**, 357–367.
- Kleuss C., Raw A. S., Lee E., Sprang S. R., Gilman A. G. (1994) Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein alpha subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9828–31.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>
- Luuk H., Plaas M., Raud S., Innos J., Sütt S., Lasner H., Abramov U., Kurrikoff K., Kõks S., Vasar E. (2009) Wfs1-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behav. Brain Res.* **198**, 334–345.
- Lüpsik A. *Mutatsiooniline muutlikku*; <http://mutatsioonid.weebly.com/geenmutatsioonid.html> viimati alla laetud 18.05.2017
- Mallol J., Ferrada C., Ferr S., Fuxe K., Franco R., Casad V., Cort A., Ciruela F., Lluís C., Canela E. I. (2006) The Two-State Dimer Receptor Model : A General Model for. *Mol. Pharmacol.* **69**, 1905–1912.
- Mazina O., Reinart-Okugbeni R., Kopanchuk S., Rinken a. (2012) BacMam System for FRET-Based cAMP Sensor Expression in Studies of Melanocortin MC1 Receptor Activation. *J. Biomol. Screen.* **17**, 1096–1101.
- Matto V., Terasmaa A., Vasar E., Kõks S. (2011) Impaired striatal dopamine output of homozygous Wfs1 mutant mice in response to [K⁺] challenge. *J. Physiol. Biochem.* **67**, 53–60.
- Missale C., NASH S. R., ROBINSON S. W., JABER M., CARON M. G. (1998) Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* **78**.
- Neer E. J. (1995) Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249–257.
- Nelson D. L., Cox M. M. (2008) *Principles of Biochemistry*.

- Nichols D. E. (2010) The Dopamine Receptors. *Psychiatry Interpers. Biol. Process.*, 399–430.
- Palmer, M. G *protein-coupled receptors*; <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Pharmacology/GPCRs.html> viimati alla laetud 20.05.2017
- Paton W. D. ., Rang H. . (1965) The Uptake of Atropine and Related Drugs by Intestinal Smooth Muscle of the Guinea-Pig in Relation to Acetylcholine Receptors. *Proc. R. Soc.* **163**.
- Pleuvry B. J. (2004) Receptors, agonists and antagonists. *Anaesth. Intensive Care Med.* **5**, 350–352.
- Pollard T. D. (2010) A Guide to Simple and Informative Binding Assays. *Mol. Biol. Cell* **21**, 4061–4067.
- Reimets R., Raud S., Loomets M., Visnapuu T., Volke V., Reimets A., Plaas M., Vasar E. (2016) Variability in the effect of antidepressants upon Wfs1-deficient mice is dependent on the drugs' mechanism of actions. *Behav. Brain Res.* **308**, 53–63.
- Reinart-Okugbeni R., Vonk A., Uustare A., Gyulai Z., Sipos A., Rinken A. (2013) 1-Substituted Apomorphines As Potent Dopamine Agonists. *Bioorganic Med. Chem.* **21**, 4143–4150.
- Ricci A., Amenta F. (1994) Dopamine D5 receptors in human peripheral blood lymphocytes: a radioligand binding study. *J. Neuroimmunol.* **53**, 1–7.
- Spring K. and Davidson M. *Introduction to Fluorescence Microscopy*; <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy> viimati muudetud 22.05.2017
- Stolerman I. P. (2015) *Encyclopedia of Psychopharmacology*.
- Swift J. L., Sergeev M., Wiseman P. W. (2010) Fluorescence microscopy investigations of ligand propagation and accessibility under adherent cells. *Biointerphases* **5**, 139–48.
- Zhang J., Xiong B., Zhen X., Zhang A. (2009) Dopamine D 1 receptor ligands: Where are we now and where are we going. *Med. Res. Rev.* **29**, 272–294.
- Zhang R., Xie X. (2012) Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* **33**, 372–84.
- Zhou Q. Y., Grandy D. K., Thambi L., Kushner J. A., Tol H. H. Van, Cone R., Pribnow D., Salon J., Bunzow J. R., Civelli O. (1990) *Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors*.
- Takei D., Ishihara H., Yamaguchi S., Yamada T., Tamura A., Katagiri H., Maruyama Y., Oka Y. (2006) WFS1 protein modulates the free Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **580**, 5635–5640.

- Tautermann C. S. (2014) GPCR structures in drug design, emerging opportunities with new structures. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 4073–4079.
- Tekko T., Laksperre T., Allikalt A., End J., Kõlvart K. R., Jagomäe T., Terasmaa A., et al. (2017) Wfs1 is expressed in dopaminergic regions of the amniote brain and modulates levels of D1-like receptors. *PLoS One* **12**, e0172825.
- Tekko T., Lilleväli K., Luuk H., Sütt S., Truu L., Örd T., Möls M., Vasar E. (2014) Initiation and developmental dynamics of Wfs1 expression in the context of neural differentiation and ER stress in mouse forebrain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **35**, 80–88.
- Tõnissaar M., Herm L., Eller M., Kõiv K., Rinken A., Harro J. (2008) Rats with high or low sociability are differently affected by chronic variable stress. *Neuroscience* **152**, 867–876.
- Undieh A. S. (2010) Pharmacology of signaling induced by dopamine D1-like receptor activation. *Pharmacol. Ther.* **128**, 37–60.
- Vallone D., Picetti R., Borrelli E. (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **24**, 125–132.
- Wilkie G. S., Korfali N., Swanson S. K., Malik P., Srsen V., Batrakou D. G., las Heras J. de, et al. (2011) Several Novel Nuclear Envelope Transmembrane Proteins Identified in Skeletal Muscle Have Cytoskeletal Associations. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M110.003129-M110.003129.
- Windels F., Kiyatkin E. A. (2006) Dopamine action in the substantia nigra pars reticulata: Ionophoretic studies in awake, unrestrained rats. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 1385–1394.
- Winlow W. (1986) The Neurobiology of Dopamine Systems. **61**, 247–269.
- Visnapuu T., Plaas M., Reimets R., Raud S., Terasmaa A., Kõks S., Sütt S., et al. (2013a) Evidence for impaired function of dopaminergic system in Wfs1-deficient mice. *Behav. Brain Res.* **244**, 90–99.
- Visnapuu T., Raud S., Loomets M., Reimets R., Sütt S., Luuk H., Plaas M., et al. (2013b) Wfs1-deficient mice display altered function of serotonergic system and increased behavioral response to antidepressants. *Front. Neurosci.* **7**, 1–8.

TÄNUAVALDUSED

Esmalt soovin tänada enda lõputöö juhendajat Anni Allikalt, kellega olen juba bakalaureuse esimesest aastast koostööd teinud. Anni positiivsus ja energilisus on mind alati inspireerinud. Hoolimata sellest, et ma ei saa mõnikord esimesel korral asjadest aru, suudab Anni jääda alati rahulikuks ning ärritumata mulle kõik selgeks teha.

Kindlasti ei saa jätta tänamata Sergei Kopanchuki. Sergeiga veetsime pikki tunde mikroskoopia ruumis, uurides rakke ja nendega seotud muutusi. Tänu temale sain väärtuslike kogemusi ja teadmisi fluorestsentsmikroskoopia vallas.

Suure panuse minu töösse ja arengusse on andnud Bioorgaanilise keemia õppetooli professor Ago Rinken. Agoga on alati mõnus vestelda ning võtan meeleldi vastu tema pakutavad väljakutsed. Lisaks tahan tänada ka kõiki teisi meie GPCR-ide töörühma inimesi, kes on suutnud probleemide korral alati abiks ja toeks olla. Usun, et viljakas koostöö jätkub ka magistriõpingutes.

Erilisi tänusõnu väärivad minu väga head sõbrad, kes on innustanud mind järjepidevalt kirjutama, et lõputöö õigel ajal valmis saaks

INFOLEHT

Wolframiini ekspressiooni mõju dopamiini retseptorite signaaliülekanaladele

Radioligandi (^3H -SCH23390) sidumiskatsetes võrreldi D_1 -tüüpi retseptorite ekspressioonitaset metsiktüüpi ja *Wfs1* kõksgeensetes hiirtes. Esimest korda suudeti näidata otsest seost wolframiini ja D_1 -tüüpi retseptorite ekspressioonitaseme vahel (Tekko *et al.* 2017). D_1 -tüüpi retseptorite hulk mõlemat tüüpi hiirte vahel oli statistiliselt erinev. Lisaks nähti fluorestsentsmikroskoopia katsetes, et WFS1-e ekspressioon sellise katsemudeli puhul D_2 retseptorile ligandi seostumist ei mõjuta.

Märksõnad: Dopamiini retseptor, wolframiin, radioligandi sidumiskatse, fluorestsentsmikroskoopia

Influence of wolframine expression levels to dopamine receptor signalling pathways

The expression levels of D_1 -like receptors in wild-type and *wfs1* knock-out mice were studied using radioligand (^3H -SCH23390) binding assay. For the first time a link between D_1 -like receptors and wolframine was shown (Tekko *et al.* 2017). The difference in receptor levels between both types of mice was statistically significant. Additionally the data obtained from fluorescence microscopy experiments show that with this kind of experiment set-up the expression of wolframine doesn't affect the ligand binding to D_2 receptor.

Keywords: Dopamine receptor, wolframine, radioligand binding assay, fluorescence microscopy

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, _____ Karl Rene Kõlvart _____,
(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
_____ Wolframiini ekspressiooni mõju dopamiini retseptorite signaaliülekandeadadele _____,
(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on _____ Anni Allikalt _____,
(juhendaja nimi)

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil,
sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja
lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu,
sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 01.06.2017 kuni autoriõiguse kehtivuse
tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2017